β-淀粉酶（β-amylase，β-AL）试剂盒说明书

（货号：G0511W 微板法 48 样）

一、产品简介：

淀粉酶包括α-淀粉酶（EC 3.2.1.1）和β-淀粉酶（EC 3.2.1.2）。淀粉酶催化淀粉水解生成还原糖，是生物体利用淀粉进行碳水化合物代谢的初级反应。生成的还原糖能使 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色得 3-氨基-5-硝基水杨酸，在 540 nm 有吸收峰；通过测定 540 nm 吸光度增加速率，计算淀粉酶活性。

本试剂盒采用 70℃加热钝化β-淀粉酶测出α-淀粉酶的活力，再与非钝化条件下测定的总活力（α+β）相比较，求出β-淀粉酶的活性。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前加 10mL 的试剂一，混匀后于 90-95℃水浴溶解，中间若有损失最终可用试剂一定容至 10mL。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

四、β-淀粉酶（β-AL）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 5min；弃上清，留沉淀，向沉淀中加入经预冷的 1mL 的 80%乙醇混匀，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 5min；弃上清，留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液，涡旋混匀，4℃放置 10min；12000rpm，4℃离心 10min；留上清，弃沉淀。上清液置冰上待测。**即为淀粉酶原液(酶液 I)，用于α-淀粉酶测定。**

上述淀粉酶原液稀释 5 倍（如吸取 0.1mL 淀粉酶原液+0.4mL 蒸馏水混匀），**即为总淀粉酶稀释液（酶液 II），用于（α+β）淀粉酶总活力的测定。**

② 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；在室温下放置提取 20min，每隔 5min 振荡 1 次，使其充分提取；12000rpm，4℃离心 10min，上清液置冰上待测。**即为淀粉酶原液(酶液 I)，用于α-淀粉酶测定。**

吸取上述淀粉酶原液 1mL，加入 4mL 蒸馏水，摇匀，**即为总淀粉酶稀释液（酶液 II），用于（α+β）淀粉酶总活力的测定。**

【注】若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500:1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 540 nm。

② 试剂二 40℃预热 10min，在 EP 管中依次加入：

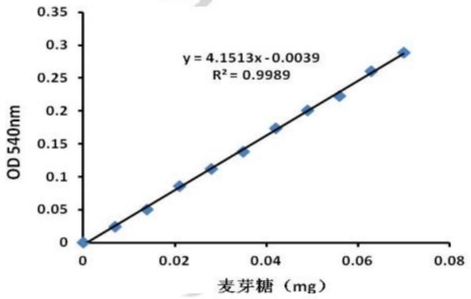
试剂名称（μL）	总淀粉酶活力测定		α- 淀粉酶活力测定	
	测定管	对照管	测定管	对照管
酶液 I			70	70
70℃水浴 15min 钝化，冷却				
酶液 II	70	70		
蒸馏水		70		70
试剂二	70		70	
40℃恒温水浴中准确保温 5min				
试剂三	140	140	140	140
混匀，95 度水浴 5min，流水冷却，取 200μL 至 96 孔板中，540nm 处读取吸光值 A，从左到右分别记为 A1、A2、A3 和 A4。$\triangle A_{总}$=（A1-A2）；$\triangle A_{\alpha\text{-淀粉酶}}$=（A3-A4）。【注】：每个测定管需设一个对照管。				

【注】1. 若ΔA 在零附近如低于 0.005，可增加样本取样质量 W，或增加样本加样量 V1（如由 70μL 增至 100μL，则试剂三相应减少，保持总体积不变），或延长反应时间 T（如由 5min 增至 20min），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

2. 若ΔA 值大于 1，则可减少加样体积 V1（如由 70μL 减至 20μL，另补加 50μL 蒸馏水），或单独对各个上清液用蒸馏水稀释后再取 70μL 加样测定。则改变后的 V1 和稀释倍数 D 代入重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 4.1513x - 0.0039； x 为标准品质量（mg），y 为吸光值△A。



2、总淀粉酶活性计算：

（1）按照样本质量计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

总淀粉酶活性(μg/min/g 鲜重)=$5\times[(\triangle A_{总}+0.0039)\div4.1513\times10^3]\div(W\times V1\div V)\div T\times D$

$=3441.3\times(\triangle A_{总}+0.0039)\div W\times D$

（2）按照蛋白质含量计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

总淀粉酶活性(μg/min/mg prot)=$5\times[(\triangle A_{总}+0.0039)\div4.1513\times10^3]\div(V1\div V\times Cpr)\div T\times D$

$=3441.3\times(\triangle A_{总}+0.0039)\div Cpr\times D$

（3）按细菌/细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

总淀粉酶活性(μg/min/10^4 cell)=$5\times[(\triangle A_{总}+0.0039)\div4.1513\times10^3]\div(V1\div V\times500)\div T\times D$

$=3441.3\times(\triangle A_{总}+0.0039)\div500\times D$

（4）液体样本中总淀粉酶活性计算：

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

总淀粉酶活性(μg/min/mL)=$5\times[(\triangle A_{总}+0.0039)\div4.1513\times10^3]\div V1\div T\times D$

$=3441.3\times(\triangle A_{总}+0.0039)\times D$

3、α-淀粉酶活性计算：

（1）按照样本质量计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

α-淀粉酶活性(μg/min/g 鲜重)=[(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)÷4.1513×10^3]÷(W×V1÷V)÷T×D

=688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)÷W×D

（2）按照蛋白质含量计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

α-淀粉酶活性(μg/min/mg prot)=[(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)÷4.1513×10^3]÷(V1÷V×Cpr)÷T×D

=688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039) ÷Cpr×D

（3）按细菌/细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

α-淀粉酶活性(μg/min/10^4 cell)=[(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)÷4.1513×10^3]÷(V1÷V×500)÷T×D

=688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039) ÷500×D

（4）液体样本中α-淀粉酶活性计算：

单位定义：每毫升每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

α-淀粉酶活性(μg/min/mL) =[(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)÷4.1513×10^3]÷V1÷T×D

=688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)×D

4、β-淀粉酶活性计算：

（1）按照样本质量计算：

单位定义：每克组织在反应体系中每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

β-淀粉酶活性(μg/min/g 鲜重)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性

=[3441.3×(△$A_{总}$+0.0039)- 688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)]÷W×D

（2）按照蛋白质含量计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活力单位。

β-淀粉酶活性(μg/min/mg prot)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性

=[3441.3×(△$A_{总}$+0.0039)-688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)]÷Cpr×D

（3）按细菌/细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

β-淀粉酶活性(μg/min/10^4 cell)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性

=[3441.3×(△$A_{总}$+0.0039)-688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)]÷500×D

（4）液体样本中β-淀粉酶活性计算：

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1μg 麦芽糖定义为 1 个酶活性单位。

β-淀粉酶活性(μg/min/mL)=淀粉酶总活性-α-淀粉酶活性

=[3441.3×(△$A_{总}$+0.0039) -688.3×(△$A_{α-淀粉酶}$+0.0039)]×D

5---总淀粉酶稀释倍数；　　V1---加入反应体系中样本体积，70μL =0.07 mL；

V---提取液总体积，1 mL；　　W---样本质量，g；　　500---细菌或细胞总数，万；

T---反应时间，5min；　　D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。

3 70μL 标准品+70μL 蒸馏水+140μL 试剂三，混匀，95 度水浴 5min，流水冷却，取 200μL 至 96 孔板中，540nm 处读取吸光值，以标准品质量为横坐标，吸光度值为纵坐标，即可制作标准曲线。